

[文章编号] 1000 – 4718(2011)09 – 1852 – 05

变性高效液相色谱技术定量检测急性髓细胞白血病 *FLT3* 基因内部串联重复突变方法学的建立

陈建兰¹, 李庆山^{1△}, 王汉平¹, 应逸¹, 杜庆华¹, 许艳丽¹, 陈晓燕¹, 谢健晋¹, 毛平¹, 李志鹏²
(¹ 广州医学院附属市一人民医院血液科, 广东 广州 510180; ² 厦门大学生命科学学院分子诊断学实验室, 福建 厦门 361005)

[摘要] 目的: 建立一种应用变性高效液相色谱技术(DHPLC) 相对定量检测急性髓细胞白血病(AML) 患者 *Fms* 样酪氨酸激酶 3(*FLT3*) 基因的内部串联重复(ITD) 突变的方法。方法: 根据 *FLT3* – ITD 突变基因多位于 14 外显子而设计引物, 用聚合酶链反应(PCR) 方法特异性扩增 121 例 AML 患者 *FLT3* – ITD 突变基因, 再用 DHPLC 技术相对定量检测 *FLT3* – ITD 等位基因突变的情况; 与毛细管电泳法(CE) 检测突变的结果对比进行该方法的有效性检验; 最后与 121 例样品 PCR 扩增产物的测序结果进行对比。结果: 经 DHPLC 分析后均能得到特征性的洗脱峰。121 例样本中检测到 *FLT3* – ITD 突变阳性的样本 13 例, 总阳性率为 10.7%, 阳性突变等位基因的比例不一, 分布范围中位数为 34.5% (11.4% – 80.2%), 为 21 – 87 bp 单个插入片段。阳性率和突变比例与 CE 方法检测结果相比较均无显著差异 ($P > 0.05$) 并与 121 例样本 *FLT3* – ITD 扩增 PCR 产物基因测序结果一致。结论: 成功建立了一种应用 DHPLC 相对定量检测 AML 患者 *FLT3* – ITD 基因突变的方法。

[关键词] 变性高效液相色谱; 白血病, 髓样, 急性; *Fms* 样酪氨酸激酶 3; 内部串联重复; 基因

[中图分类号] R733.71

[文献标识码] A

doi: 10.3969/j.issn.1000 – 4718.2011.09.039

Establishment of a method to quantitatively detect *FLT3* internal tandem duplication in acute myeloid leukemia with denaturing high – performance liquid chromatography

CHEN Jian – lan¹, LI Qing – shan¹, WANG Han – ping¹, YING Yi¹, DU Qing – hua¹, XU Yan – li¹, CHEN Xiao – yan¹, XIE Jian – jin¹, MAO Ping¹, LI Zhi – peng²

(¹ Department of Hematology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, The Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, China; ² Laboratory of Molecular Diagnosis, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China. E – mail: qingshan_l@yahoo.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To establish a relatively – quantitative method to detect the internal tandem duplication (ITD) mutation of *Fms* – like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) gene in acute myeloid leukemia (AML) patients using denaturing high – performance liquid chromatography (DHPLC). **METHODS:** According to the fact that much more *FLT3* – ITD mutations are located in exon 14, we designed the primers, and use the method of polymerase chain reaction (PCR) to specifically amplify *FLT3* – ITD mutation gene in 121 cases of AML, and relatively quantified the situation of mutant allelic gene of *FLT3* – ITD by the method of DHPLC. The effectiveness of DHPLC was verified by the method of capillary electrophoresis (CE). The sequenced results from PCR amplified products of 121 samples were compared. **RESULTS:** A characteristic of elution peak was detected by DHPLC with 10.7% overall positive rate (13/121) and varied in the proportion of mutant alleles, with a single duplicated insert fragment from 21 bp to 87 bp. The median range of mutant alleles was 34.5% (11.4% – 80.2%). No significant difference of the positive rates and mutation proportions between the results with DHPLC and the results with CE method was observed. The results of *FLT3* – ITD mutant gene of 121 samples were consistent with the results using sequencing method. **CONCLUSION:** A relatively – quantitative method to analyze AML patients with *FLT3* – ITD mutation by DHPLC is successfully established.

[KEY WORDS] Denaturing high – performance liquid chromatography; Leukemia, myeloid, acute; *Fms* – like tyrosine kinase 3; Internal tandem duplication; Genes

[收稿日期] 2011 – 03 – 02

[修回日期] 2011 – 05 – 09

△通讯作者 Tel: 020 – 81048160; E – mail: qingshan_l@yahoo.com

在急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)分层治疗的研究中,Fms样酪氨酸激酶3(Fms-like tyrosine kinase 3, *FLT3*)基因近膜区的内部串联重复(internal tandem duplication, ITD)是最早被识别的分子标记之一,其存在与否被认为对AML的预后具有重要的判断价值。有研究认为^[1,2],*FLT3*-ITD的这种预测价值与突变等位基因的比例有关,疾病复发率(relapse rate, RR)、无病生存率(disease-free survival, DFS)和总体生存期(overall survival, OS)随着突变比例的升高均有恶化趋势,且高白细胞也在高突变比例中更加突出,高比例突变的*FLT3*-ITD预测价值显得更大,因而定量分析*FLT3*-ITD尤为重要。通常情况下由于毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)的高效性和高敏感性,*FLT3*-ITD相对定量分析主要是采用此法^[3]。变性高效液相色谱技术(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)已经用于检测慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML) ABL激酶区点突变^[4],且技术方法稳定可靠,而少见DHPLC用于检测*FLT3*-ITD,故我们尝试运用DHPLC技术建立相对定量检测*FLT3*-ITD突变比例的方法,对121例临床病例进行检测,并与CE分析结果进行了比较,最后对比测序结果。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 研究对象 为患者,共121例,其中40例来自2007年1月-2010年12月我院住院或门诊初治经细胞形态学、免疫组织化学染色及流式细胞术免疫学分型并参照《血液病诊断及疗效标准》^[5]确诊为原发性AML病例,其余81例来自2007年1月-2010年12月厦门大学中山医院与第一附属医院的住院或门诊初治同上确诊为AML病例,由厦门大学生命科学学院分子诊断学实验室提供。其中M1 11例,M2 35例,M3 35例,M4 9例,M5 26例,M6 4例,M7 1例;男59例,女62例;中位年龄35(16-77)岁。阴性对照为10例健康人群。

1.2 主要试剂 EZHigh™ DNA kit 购自 Texas BioGene。5× buffer 溶液(含2.5 mmol/L dNTPs,2.5 mmol/L Mg²⁺)和无RNase H₂O均购自 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司;10× LCGreen plus dye、Hotstart polymerase 均为 Qiagen 产品;*FLT3*-ITD 正反向引物参照 NCBI 设计,由 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司合成。DHPLC 流动液:三乙胺乙酸盐(TEAA)和乙腈(ACN)均购自 Transgenomic。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取 原保存的固定后的骨髓样本用 EZHigh™ DNA kit 提取样本 DNA,具体操作步骤按试剂盒说明进行。采用紫外分光光度计测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 值确定 DNA 产物的浓度。将提取的 DNA 置于 -80℃ 冻存备用。

2.2 PCR 扩增 针对 *FLT3*-ITD 突变主要发生在 14 号外显子上,设计扩增片段长度为 328 bp,正向引物 5'-AGC AAT TTA GGT ATG AAA GCC AGC TA-3',反向引物 5'-GGT TGC CGT CAA AAT GCT GAA AG-3'。反应体系组成为:5× buffer 5.0 μL;正向引物(10 μmol/L):0.5 μL;反向引物

(10 μmol/L):0.5 μL; Hotstart polymerase 1.0 μL, DNA 2.0 μL(根据浓度调到 50-100 ng);加无 RNA 酶水至体积 25 μL。上 ABI Veriti PCR 扩增仪,反应条件:95℃ 预变性 10 min,94℃ 30 s,55℃ 1 min,72℃ 1 min,循环 29 次。72℃ 延伸 7 min,1 个循环。将 PCR 产物置 95℃ 变性 5 min,然后降温至 25℃ 1 min,这时混合样品中就会形成同源和异源的双链。

2.3 DHPLC 分析 上 WAVE 3500 型分析仪前先配流动液:Buffer A 液(0.1 mol/L TEAA):50 mL 2 mmol/L TEAA + 250 μL ACN(乙腈)再加 HPLC 纯水定容至 1 L。Buffer B 液(0.1 mol/L TEAA,含 25% ACN):50 mL 2 mmol/L TEAA + 250 mL ACN 再加 HPLC 纯水定容至 1 L。将变性后的 PCR 产物放入到 WAVE 3500 型分析仪 96 孔样品池上,在 50℃ 的条件下分析待测样本。根据程序指令,进样器自动吸取 15 μL PCR 产物,注入 DNasep 分离柱内,被流动相以 0.9 mL/min 的流速进行洗脱,在 260 nm 波长处读取吸光度(A)值。经系统自动处理后,形成 DHPLC 峰形图谱,结果被自动存储,供分析鉴定。每个样品重复 3 次实验。

正常人基因组和 *FLT3*-ITD 野生型标本 DHPLC 分析时表现为单 1 洗脱峰,突变型样本则表现为 2 个或 3 个洗脱峰。与标准参考模板对比,通过观察异源双链洗脱峰出现与否,确定突变存在的情况;然后通过对洗脱峰的峰面积进行计算,获得突变等位基因的比例,计算公式:

$$FLT3-ITD \text{ 突变比例}(\%) =$$

$$\frac{\text{突变峰面积} + \text{杂合峰面积} / 2}{\text{突变峰面积} + \text{杂合峰面积} + \text{野生峰面积}} \times 100\%。$$

2.4 CE 方法分析 在厦门大学生命科学学院分子诊断学实验室完成,首先也是针对 *FLT3*-ITD 基因突变多发生在 14 号外显子上设计引物,设计扩增片段为 367 bp。摸索反应体系和反应条件后进行 PCR 扩增,摸索反应体系和反应条件,25 μL 反应体系含 5 μL 10× PCR buffer(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂),0.2 mmol/L dNTPs,1 U Taq HS DNA 聚合酶,正反向引物(各自均为 150 nmol/L)和 5 μL gDNA 模板。在 T3 Thermocycler 上进行 PCR 扩增,程序如下:95℃ 预变性 3 min;18 个循环的 Touchdown PCR 程序为 95℃ 30 s,61℃ 30 s(每个循环下降 0.5℃),72℃ 40 s;17 个循环的普通 PCR 程序为 95℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 40 s;72℃ 7 min。

后取 1 μL PCR 产物(用去离子水稀释 50-200 倍)、16.5 μL 去离子甲酰胺(SLS)、2.5 μL 荧光标记的分子量标准(CEQ 600 size standard mixture, Beckman Coulter, p/n 608095,用 SLS 稀释 10 倍)混匀后,转移到 96 孔加样板,并滴加 1 滴石蜡油防止挥发。在 CEQ8800 遗传分析系统上,采用“Frag-2”程序运行,程序进行自动化操作。实验结束后,根据仪器自带软件进行“Fragment Analysis”,对毛细管电泳结果进行片段分析,确定是否存在 *FLT3*-ITD 突变。正常人基因组 DNA 标本和野生型 PCR 扩增产物在 367 bp 处出现单个尖峰。突变型标本除在 367 bp 处出现单峰外,在 367 bp 后将出现另一峰,根据软件给出的野生型峰面积 S1 和突变型峰面积 S2,按照以下公式来计算突变比例,计算公式:

$$FLT3-ITD \text{ 突变比例}(\%) = S2 / (S1 + S2) \times 100\%。$$

2.5 DNA 测序 将所有样品 DNA 送北京六合华大基因科技有限公司扩增后测序验证;再将测序结果利用 DNAMAN 软件分析与 NCBI 网上的 FLT3 基因进行比对确定基因突变情况;最后与 2 种方法检测结果对比。

3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件包对实验数据进行统计学分析。两组计量资料均数比较采用随机配对设计资料 *t* 检验,假定差值服从正态分布。

结 果

1 AML 患者 DHPLC 分析结果

121 例患者样本中有 108 例样本扩增后进行分析出现单 1 洗脱峰,为 FLT3 - ITD 野生型,121 例中(4 号、5 号、7 号、8 号、11 号、14 号、28 号、79 号、85 号、93 号、107 号、110 号和 118 号)有 2 个或 3 个洗脱峰,即为 FLT3 - ITD 突变型的样本,见图 1,总阳性率为 13/121(10.7%)。根据以上所述对应的公式计算出阳性样本的突变比例。每例阳性样本 3 次实验所得突变比例间无显著差异,取平均值。得出 13 例阳性样本突变等位基因的比例不一,分布范围中位数 34.0%(12.4% - 87.0%),见表 1。正常对照的 10 例健康人群 PCR 产物的 DHPLC 洗脱峰也全为单 1 峰。

2 AML 患者 CE 分析结果

正常对照健康成人 DNA 标本进行 CE 的片段分析结果在 367 bp 处出现单个尖峰。121 例 AML 标本中 108 例在 367 bp 处出现单个尖峰,为 FLT3 - ITD 野生型;13 例除 367 bp 处峰之外在 367 bp 后出现额外峰,为 FLT3 - ITD 突变型(见 121 例样本中 4 号、5 号、7 号、8 号、11 号、14 号、28 号、79 号、85 号、93 号、107 号、110 号和 118 号),见图 2,总阳性率为 13/121(10.7%)。根据以上所述对应的公式计算出阳性样本的突变比例。每例阳性样本重复 3 次实验所得突变比例间无显著差异,取平均值。13 例阳性样本间比较突变等位基因的比例不一,分布范围中位数为 34.5%(11.4% - 80.2%),见表 1。

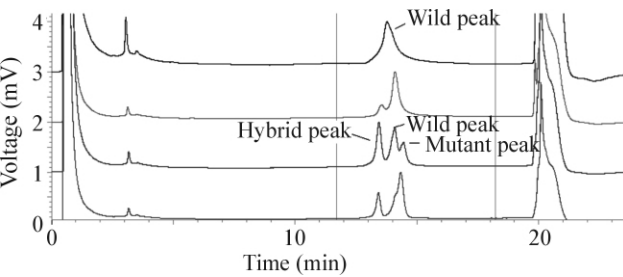


Figure 1. The DHPLC characteristic elution peaks. From top to bottom: represent sample of wildtype FLT3 - ITD; the 28th sample: FLT3 - ITD mutation in the low percentage (12.4%); the 8th sample: FLT3 - ITD mutation in the moderate percentage (42.3%); the 7th sample: FLT3 - ITD mutation in the high proportion (87.0%).

图 1 DHPLC 的特征性洗脱峰

表 1 DHPLC 和 CE 定量分析 FLT3 - ITD 突变阳性样本的结果对比

Table 1. The quantitative analysis of FLT3 - ITD mutation in positive samples examined with DHPLC and CE methods(%, the average for three repetitive experiments)

Sample's No.	DHPLC	CE
4	42.8	43.9
5	27.5	29.7
7	87.0	80.2
8	42.3	46.2
11	34.0	34.5
14	36.5	35.0
28	12.4	11.4
79	79.8	76.5
85	16.3	15.8
93	16.3	16.6
107	23.5	25.2
110	76.3	73.5
118	16.2	15.0

3 2 种方法结果对比

2 种方法阳性定性结果吻合,阳性率是一样的。2 种方法阳性定量结果之间比较也无显著差异($P > 0.05$)。

参照文献^[1],我们将突变比例分成 3 组。低突变(< 25%)有 5 例,中突变($\geq 25\%$ 且 $\leq 50\%$)有 5 例,高突变(> 50%)有 3 例。

4 测序验证

将所得样品进行了测序验证,发现 4 号、5 号、7 号、8 号、11 号、14 号、28 号、79 号、85 号、93 号、107 号、110 号和 118 号样品为单个串联重复突变,插入片段大小为 21 - 87 bp 不等,均为单个插入片段。结果与 DHPLC、CE 检测到的阳性结果吻合。其余 108 例为 FLT3 - ITD 阴性。

讨 论

AML 分层治疗是近年来研究的热点,染色体核型异常的 AML 病例可按照 WHO 的标准进行分层管理,而占原发病例 40% - 50% 的核型正常的中间型病例具有高度异质性,目前尚缺乏足够分子标记对其进行精细的分层管理和准确的预后判断^[6]。作为最早被发现具有不良预后判断价值的分子指标之一,FLT3 - ITD 的研究最为广泛,早几年国内外针对 FLT3 - ITD 定性研究较多。尹列芬等^[7]已用 DHPLC 技术定性检测了 60 例 AML 患者 FLT3 - ITD 基因突变情况,认为 FLT3 - ITD 基因突变可作为预测 AML 预后的一个指标。而目前这种预测价值探索深入化,有些研究者认为 FLT3 - ITD 等位基因突变水平的不同,预后也不同;比尹列芬他们单纯的定性研究更具有预后判断价值。比如有一项采用 CE 的方法^[1]的研究以 FLT3 - ITD 突变等位基因水平和 FLT3 - ITD 存在与否作为分组指标,比较分析了 2 组病例 RR、DFS 和 OS,显示前者的预测作用明显强于后者,差异极显著;随着 FLT3 - ITD 突变比例的增加,患者的 RR 也随之增加,DFS 和

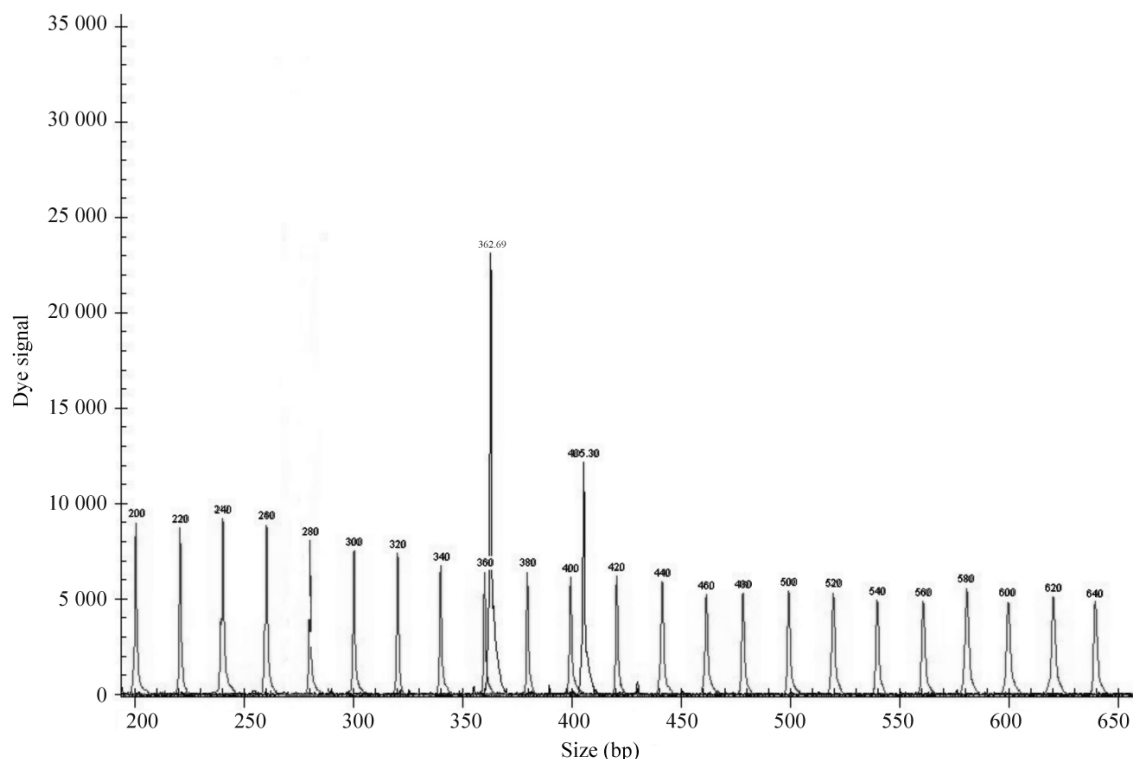


Figure 2. The analysis result of one sample using CE method.

图2 某一样品的 CE 方法分析结果

OS 降低, 预后则变差; 低突变水平(< 25%) 患者的预后较野生型患者差, 中度突变水平(25% - 50%) 患者的预后又较低突变水平患者差, 高度突变水平(> 50%) 患者的预后最差。Bullinger 等^[8] 研究提示对 *FLT3* - ITD 突变等位基因进行定量分析, 有可能对 AML 进行更精细的治疗分层和更准确的预后判断。不过 Thiede 等^[2] 则认为 *FLT3* - ITD 低突变水平患者的预后与野生型患者相比并无差别, 只有高水平的 *FLT3* - ITD 突变才具有预后判断价值。

所以定量检测 *FLT3* - ITD 对日后详细判断正常核型 AML 患者预后及指导治疗具有更重要的意义。但是目前多用上述的 CE 方法进行检测, 该方法对仪器设备要求高或技术方法上繁琐耗时长, 不利于快速判断, 为进一步探讨 *FLT3* - ITD 突变等位基因水平的临床价值, 我们根据自身实验条件, 在 DHPLC 定性检测基因突变功能的基础上对 *FLT3* - ITD 突变等位基因进行定量检测。它是一项敏感可靠的 DNA 分析技术^[9]。 *FLT3* - ITD 基因突变运用该法的检测是基于异源双链的形成, 根据 PCR 产物变性复性后, 形成了同源双链和异源双链, 而异源双链由于碱基对不匹配, 在部分变性的温度条件下, 会在不匹配的碱基对处形成部分解链。由于单链 DNA 带负电荷减少, 结合力弱, 因此, 异源双链比同源双链先洗脱出来。根据其在柱子上保留时间的不同, 可将同源双链和异源双链分离。如此就可分离检测出由于 ITD 的插入而引起的 *FLT3* 基因长度多态性, 再通过对洗脱峰面积的计算, 对 *FLT3* - ITD 突变等位基因即可进行定量分析。

应用该方法, 我们成功地对 121 例 AML 样本进行了检测分析, 对 13 例突变阳性的样本进行了定量计算。为验证 DHPLC 定量结果的准确性, 我们采用 CE 的方法对样本重复进行了分析。从表 1 可知 2 种方法定量的结果完全一致($P >$

0.05), 表明本研究的 DHPLC 定量检测方法准确可靠、稳定。而本组的研究群体中, *FLT3* - ITD 突变的阳性率只有 10.7% (13/121), 远低于文献报道的 AML 中 20% - 30% 的阳性检出率, 正常核型 AML 中 30% - 40%^[9]。而这较低的阳性率可能与样本数量有限、地域分布局限性有关。而且, 目前有研究认为 *FLT3* - ITD 定量结果不同, 预后比较有显著差异, 当然, 这有待我们后续进一步研究。

与以往多数采用的 CE 方法检测 *FLT3* 基因突变情况相比, DHPLC 除具有同 CE 方法一样快速、高重复性、自动化、准确的优点外, 且具有高通量、快捷、成本相对低的特点^[10]。它不需要荧光标记的引物, 也不需要任何 PCR 纯化, 简化了操作步骤。经我们对比观察, DHPLC 方法检测 1 个样品所花时间不足 CE 方法的一半, 而我们的研究又证实 DHPLC 的结果与 CE 的结果一致, 更进一步证实了 DHPLC 方法的可行性和实效性。虽然突变比例极高时该法不如 CE 精确, 但计算机软件中的切割峰功能能使计算结果达到较高精确性, 且并不影响对高突变比例样本界限的判定。

综上所述, 建立 DHPLC 技术相对定量检测 *FLT3* - ITD 突变情况, 能为急性髓细胞白血病临床治疗与预后提供了更详尽的参考指标。

(致谢: 感谢北京六合华大基因科技有限公司对 *FLT3* - ITD 突变基因测序; 感谢厦门大学生命科学学院分子诊断学实验室完成 CE 方法检测。)

[参 考 文 献]

- [1] Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM mutations in a large cohort of young

- adult patients with acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2776 – 2784.
- [2] Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3 – activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis [J]. *Blood* 2002, 99(12): 4326 – 4335.
- [3] Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3 – ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2005, 19(8): 1479 – 1482.
- [4] 秦效英, 秦亚湊, 刘艳荣, 等. 应用变性高效液相色谱检测伊马替尼治疗后慢性髓性白血病患者 ABL 激酶区点突变 [J]. *中华检验医学杂志* 2006, 29(11): 991 – 995.
- [5] 张之南, 沈 悌. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社 2007. 106 – 116.
- [6] Schnitger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype and prognosis in the AMLCG Study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease [J]. *Blood*, 2002, 100(1): 59 – 66.
- [7] 尹列芬, 王 晔, 姚 锦, 等. 急性髓细胞白血病 FLT3 – ITD 基因突变的检测及其临床意义 [J]. *西安交通大学学报(医学版)* 2009, 30(4): 453 – 455.
- [8] Bullinger L, Döhner K, Kranz R, et al. An FLT3 gene – expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML [J]. *Blood* 2008, 111(9): 4490 – 4495.
- [9] Jiang A, Jiang H, Brandwein J, et al. Prognostic factors in normal karyotype acute myeloid leukemia in the absence of the FLT3 – ITD mutation [J]. *Leuk Res* 2011, 35(4): 492 – 498.
- [10] 李 莉, 王 翀, 陈瑶生. DHPLC 系统工作原理及其应用 [J]. *生物技术通报* 2006(51): 120 – 124.

(上接第 1847 页)

- [27] Davis JE, Braucher DR, Walker – Daniels J, et al. Absence of Tlr2 protects against high – fat diet – induced inflammation and results in greater insulin – stimulated glucose transport in cultured adipocytes [J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22(2): 136 – 141.
- [28] Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, et al. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(29): 30817 – 30822.
- [29] Yatagai T, Nagasaka S, Taniguchi A, et al. Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus [J]. *Metabolism*, 2003, 52(10): 1274 – 1278.
- [30] Ajuwon KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS – induced NF – κ B activation and IL – 6 production and increases PPAR γ 2 expression in adipocytes [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288(5): R1220 – R1225.
- [31] 陈新忠, 孙宗全, 郑向阳, 等. 脂联素阻断游离脂肪酸介导的单核细胞 TLR4 信号途径的激活 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(11): 2117 – 2120.
- [32] Suganami T, Mieda T, Itoh M, et al. Attenuation of obesity – induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll – like receptor 4 mutation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354(1): 45 – 49.
- [33] Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR – 2 in the activation of nuclear factor κ B by oxidative stress in cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(7): 5197 – 5203.
- [34] Monaco C, Gregan SM, Navin TJ, et al. Toll – like receptor – 2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2009, 120(24): 2462 – 2469.
- [35] Vijay – Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll – like receptor 5 [J]. *Science*, 2010, 328(5975): 228 – 231.
- [36] Jiang W, Sun R, Wei H, et al. Toll – like receptor 3 ligand and attenuates LPS – induced liver injury by down – regulation of toll – like receptor 4 expression on macrophages [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(47): 17077 – 17082.
- [37] Vitseva OI, Tanriverdi K, Tchkonja TT, et al. Inducible Toll – like receptor and NF – κ B regulatory pathway expression in human adipose tissue [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2008, 16(5): 932 – 937.
- [38] Uchikoshi Y. Narrative development in bilingual kindergarteners: can Arthur help? [J]. *Dev Psychol*, 2005, 41(3): 464 – 478.
- [39] Rahmouni K, Fath MA, Seo S, et al. Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet – Biedl syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(4): 1458 – 1467.
- [40] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. *Nature*, 1994, 372(6505): 425 – 432.
- [41] Galletti F, Delia L, Barba G, et al. High – circulating leptin levels are associated with greater risk of hypertension in men independently of body mass and insulin resistance: results of an eight – year follow – up study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(10): 3922 – 3926.